مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هجدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۱۲۶-۱۱۹

کاربرد روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی در اندازه‌گیری باقیمانده‌های آموکسی‌سیلین، کلوگزاسیلین و اریترومایسین در نمونه‌های شیر گاو با استفاده از کروماتوگرافی‌مایع با کارائی بالا

محمدرضا افشارمقدم[۱و۲] ، جلیل خندقی [۳و۴]، صمد وجدی حکم‌آباد[۵]

۱- استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار مرکز آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران

۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۵- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم دامی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران. پست الکترونیکی: Samad.Vajdi@iausa.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: انواع مختلفی از آنتی بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام و به طور بی رویه برای رشد و درمان دام مورد استفاده قرار می‌گیرد که سبب تجمع باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در محصولات دامی مانند شیر خواهدشد. مصرف شیر آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیک بالاتر از حد مجاز باعث ایجاد سمیت برای انسان و معضل بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شود. به همین دلیل پایش باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر و لبنیات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلوگزاسیلین و اریترومایسین از شیر گاو توسعه داده شده و اندازه‌گیری کمی آنها به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی صورت گرفت. به‌علاوه اثر پارامترهای مختلف موثر در کارایی استخراج مانند حجم عامل رسوب دهنده و زمان ورتکس کردن و همچنین نوع و مقدار حلال استخراج‌کننده، اثر نمک‌زنی و دمای محلول آبی بهینه‌سازی شدند.

یافته‌ها: آنالیز نمونه‌های شیر وجود آموکسی سیلین در ۸ نمونه شیر را نشان داد که همگی بالاتر از حد مجاز بودند. دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های شیر یافت نشد. روش پیشنهادی از کارایی بالایی در استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های هدف از نمونه‌های شیر برخوردار بود به‌طوریکه تکرارپذیری روش بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی ۳ تا ۴/۵ بوده و تحت شرایط بهینه، کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنالیت‌ها ۸۷-۷۸ درصد و حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب کمتر از ۱/۱ و ۳/۷ نانوگرم در میلی‌لیتر بدست آمدند.

نتیجه‌گیری: روش توسعه داده شده برای اندازه‌گیری آنالیت‌های انتخابی در شیر گاو مناسب بوده و حد تشخیص آن کمتر از حداکثر مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیک، شیر، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، توسعه روش، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

• مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها موادی هستند که قادر به کشتن یا مهار رشد میکروارگانیسم‌ها بوده و بخش عمده‌ای از آن‌ها در صنعت دامپروری و برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. همچنین برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد به خوراک دام افزوده شده و سبب بهبود کارایی خوراک می‌گردد (۱).

گرچه سلامت گله حیوانات در نهایت موجب دسترسی مصرف کنندگان به محصولات غذایی سالم و با کیفیت بالا و قیمت مناسب مانند گوشت و شیر می‌شود ولی از طرفی استفاده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]

بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مشکلات بهداشتی دیگری مانند معضل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و یا ایجاد واکنش‌های آلرژی، سمیت و سرطان‌زایی را به‌دنبال خواهد داشت. در حال حاضر میانگین جهانی مصرف سالانه مواد ضد میکروبی به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان تولید شده بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم است (۲).

به‌طور کلی، روش های تجزیه‌ای برای پایش باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان در دو گروه روش‌های غربالگری و تاییدی طبقه بندی کرد. روش‌های مهار میکروبی مانند روش چهار پلیتی به دلیل اینکه آسان و مقرون به صرفه بوده و قادرند آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را در یک آزمایش واحد پوشش دهد، پرکاربردترین روش برای تشخیص و بخصوص غربالگری باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی با منشاء دامی هستند اما دقت پایینی داشته و احتمال نمونه‌های مثبت کاذب در این روش زیاد است (۳). از طرفی، با توجه به حدود مجاز (Maximum residue limits) توصیه شده برای باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در محصولات غذایی توسط سازمان‌های نظارتی مانند اتحادیه اروپا (معمولاً ppb)، برای تشخیص مقادیر پایین روش های تجزیه‌ای حساس و کارآمد مورد نیاز است. که کروماتوگرافی مایع یکی از آن‌ها است (۵، ۴).

عموماً قبل از تجزیه دستگاهی نمونه‌ها، یک مرحله آماده‌سازی برای حذف ترکیبات مزاحم و پیش تغلیظ آنالیت‌ها مورد نیاز است (۶). تاکنون روش‌های گوناگونی برای استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی ارائه شده‌است که روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) یکی از انواع متداول آن به‌شمار می‌رود (۱۰-۷). در این روش یک حلال پخش کننده قطبی و یک حلال استخراج کننده غیرقطبی به محلول آبی تزریق و مخلوط نهایی برای جداسازی فازها سانتریفیوژ می شود. اخیراً مایعات یونی (Ionic liquids) دارای نقطه ذوب پایین، سمیت کمتر و همچنین سازگار با محیط زیست هستند، به عنوان یک استخراج کننده جایگزین برای روش DLLME پیشنهاد شده‌اند (۱۲، ۱۱).

هدف کار پژوهشی حاضر توسعه و معرفی یک روش کارآمد برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (Amoxicillin)، کلوگزاسیلین (Cloxacillin) و اریتروماییسین (Erythromycin) از نمونه‌های شیر گاو بود. برای این‌منظور از روش میکرو استخراج مایع مایع پخشی کمک شده بوسیله مایعات یونی استفاده شده و سپس اندازه‌گیری باقیمانده‌های آنتی بیوتیکی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی (HPLC–diode array detector) انجام‌گرفت.

• مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و مواد شیمیایی

تعداد ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه در پاییز سال ۱۴۰۱ به‌صورت تصادفی از محل‌های عرضه در شهر تبریز تهیه و در آزمایشگاه مرکز ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی‌تبریز تحت شرایط بهینه‌شده استخراج و آنالیز شدند. تری کلرواستیک اسید، ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلوئورو فسفات ([C6MIM][PF6])، ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلوئورو فسفات ([C4MIM][PF6]) و سدیم‌کلرید با درجه خلوص تجزیه¬ای از شرکت مرک (Darmstadt, Merck, Germany) و استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) تهیه شد. همچنین به‌منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی، محلول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) هر روز سه‌بار به دستگاه HPLC (Model 1200, DAD system, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) تزریق و فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج مورد ارزیابی قرار گرفت.

بهینه‌سازی شرایط استخراج

برای این منظور مقدار اسید تری‌کلرواستیک به‌عنوان عامل رسوب‌دهنده (از بین مقادیر۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم) و همچنین زمان ورتکس کردن (یک تا ۵ دقیقه) قبل از سانتریفیوژ شیر برای جداسازی رسوب پروتئین‌های شیر بهینه‌سازی شد. همچنین عوامل موثر در مرحله استخراج مایع-مایع پخشی شامل نوع حلال استخراج‌کننده (از بین مایعات یونی $[C_6MIM][PF_6]$ و $[C_4MIM][PF_6]$)، حجم حلال (با اضافه کردن مقادیر ۵۰، ۶۰ و ۱۵۰ میکرولیتر)، اثر نمک‌زنی (با افزودن مقادیر متفاوتی از نمک در محدوده صفر تا ۵ درصد وزنی-حجمی) و تنظیم دمای محلول آبی در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس بهینه‌سازی گردید. برای بررسی عوامل مؤثر در روش توسعه داده‌شده از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده و تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف بررسی شد (۱۳). این آزمون‌ها و آزمون‌های اعتبار بخشی روش در ۳ تکرار انجام و نتایج به‌صورت میانگین داده‌ها ± انحراف استاندارد بیان شدند.

روش استخراج

این مطالعه بر پایه روش استخراج مایع-مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی به‌منظور استخراج باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی از نمونه‌های شیر گاو توسعه داده‌شده و اندازه‌گیری آن‌ها به‌کمک کروماتوگرافی مایع با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]

کارائی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی صورت گرفته‌است. برای این منظور، ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه شیر حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به داخل یک لوله آزمایش منتقل و بر روی آن ۱۵۰ میلی‌گرم تری کلرواستیک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه ورتکس شده و سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۲ میلی لیتر از فاز رویی (حاوی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه) برداشته شده و با ۴ میلی لیتر محلول سدیم کلرید به غلظت ۳ درصد وزنی-حجمی مخلوط شد. پس از آن، ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلوئورو فسفات به داخل محلول آزمایشی اضافه و محلول در داخل حمام آب در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا مایع یونی کاملاً حل شود. سپس محلول در داخل حمام آب یخ قرار گرفت. در این مرحله حلالیت مایع یونی در محلول آزمایشی کاسته شده و این حلال به صورت قطرات ریزی در داخل محلول پخش می شود. محلول ابری شکل حاصله سانتریفوژ شده و فاز ته‌نشین شده به سیستم HPLC-DAD تزریق شد. برای دستیابی به حداکثر تفکیک در سیستم کروماتوگرافی، شرایط کارکرد HPLC-DAD برای جداسازی آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق جدول ۱ انتخاب شد.

اعتبارسنجی روش

پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، مشخصات تجزیه‌ای روش به‌کار رفته برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌ها، شامل فاکتورهایی از قبیل حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantification)، تکرارپذیری (RSD%)، فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج، ارزیابی و محاسبه شدند (۱۴).

• یافته‌ها

نتایج بهینه‌سازی پارامترهای موثر در استخراج

حجم عامل رسوب دهنده: نتایج به‌دست آمده نشان داد که افزودن مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم از اسید تری کلرو استیک بهترین نتیجه را از نظر افزایش بازده استخراج سه آنالیت مورد مطالعه داشت. از این رو در ادامه مطالعه از این مقدار عامل رسوب دهنده استفاده شد.

مدت زمان ورتکس کردن نمونه: بررسی اثر این پارامتر با مخلوط نمودن نمونه های شیر پس از افزودن اسید و در زمان‌های مختلف صورت گرفت. نتایج نشان داد سه دقیقه ورتکس نمودن نمونه‌ها سبب افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای شده و پس از آن بازده استخراج کاهش یافت.

اثر نمک زنی: افزودن نمک و افزایش قدرت یونی محیط تا مقدار ۲ درصد وزنی/حجمی از کلرید سدیم منجر به افزایش کارایی استخراج شد. همانطور که در نمودار ۱ قابل مشاهده است، در استفاده از مقادیر بیشتر نمک سیگنال‌های تجزیه‌ای مربوط به آنالیت‌ها کاهش یافت لذا در ادامه مطالعه از افزودن ۲ درصد نمک استفاده شد.

نوع حلال استخراج‌کننده: در این راستا دو مایع یونی مختلف مورد استفاده قرار گرفت. چنان‌که در نمودار ۱ دیده می‌شود، حلال ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلوئورو فسفات دارای بیشترین کارایی در استخراج آنالیت‌های مورد نظر بود و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

حجم حلال: بررسی سیگنال‌های تجزیه‌ای بر اساس حجم حلال استخراج‌کننده نشان داد که افزایش حجم حلال از ۵۰ به ۷۰ میکرولیتر سبب تغییر راندمان استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه نشد. از این‌رو به دلیل مصرف کم حلال آلی، ۵۰ میکرولیتر به‌عنوان حجم بهینه حلال انتخاب گردید.

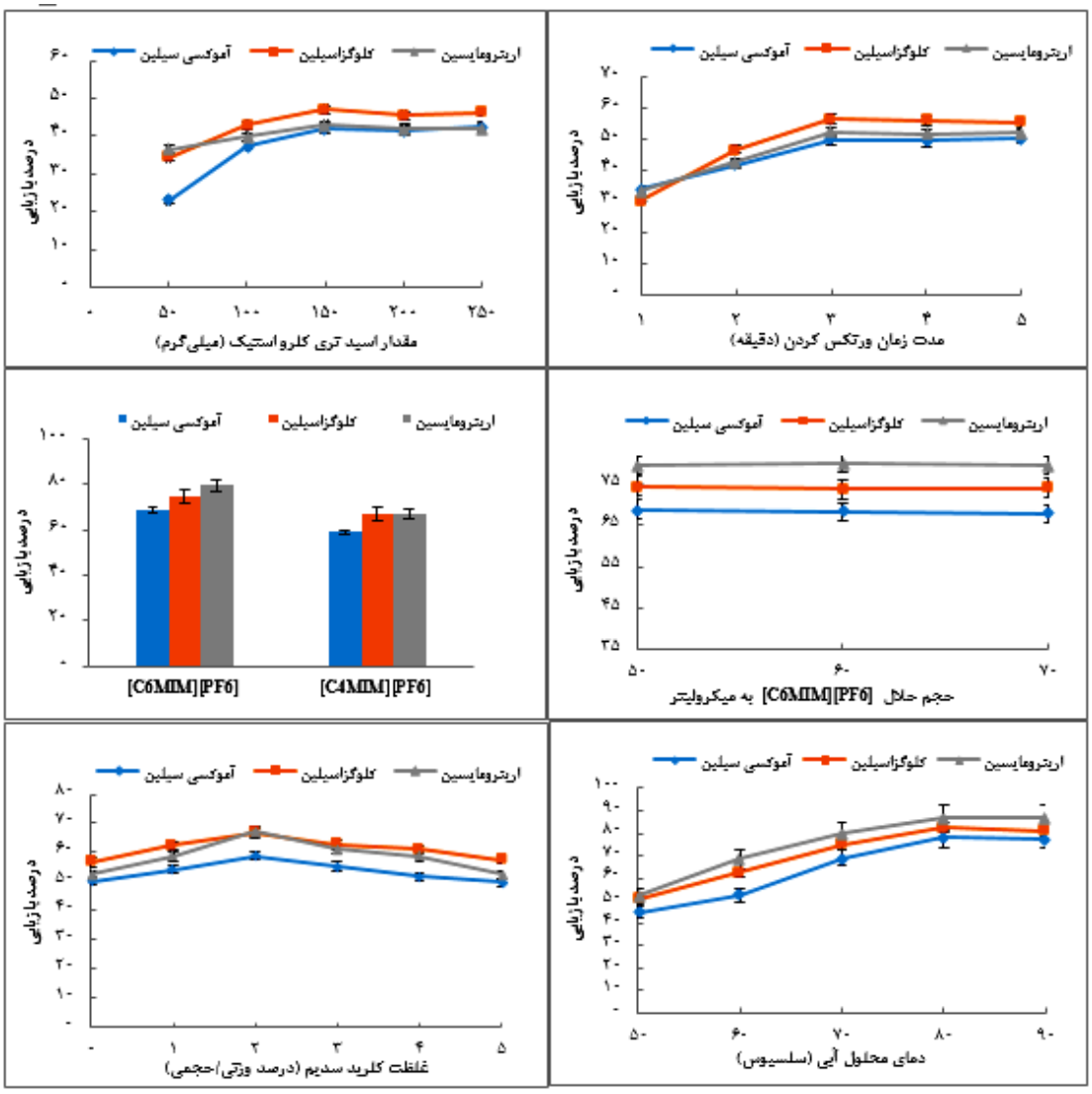
دمای فاز آبی: دمای محلول حاوی نمونه نقش موثری در کارایی روش دارد و می‌تواند کارایی روش را بهبود بخشد. برای به دست آوردن دمای بهینه، آنالیزها در دماهای مختلف در محدوده ۵۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده (شکل ۱) نشان داد که بازده استخراج آنالیت‌ها تا ۸۰ درجه سلسیوس افزایش و سپس ثابت می‌ماند. لازم به توضیح است که در دماهای کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد مایع یونی استفاده شده به عنوان حلال استخراج کننده در محلول نمونه حل نشد.

جدول ۱. شرایط بهینه‌ی کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا به منظور آنالیز باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های شیر گاو

نوع ستون	ستون Xbridge C18 به طول ۵ سانتی‌متر، قطر خارجی: ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات: ۳/۵ میکرومتر
نوع شستشو	شویش گرادیانی
ترکیب فازمتحرک	حلال A: فرمیک اسید ۰/۲ درصد HPLC گرید، حلال B: مخلوط استونیتریل و متانول با نسبت حجمی ۷۰ به ۳۰ درصد با سرعت جریان ۰/۲ میلی‌لیتر در دقیقه
نحوه اعمال گرادیان	۳ تا ۶ دقیقه: گرادیان خطی از ۲۰ تا ۸۰ درصد حلال B ۶-۸ دقیقه: گرادیان خطی از ۲۰ تا ۸۰ درصد حلال A ۲ دقیقه: حلال A= ۸۰ درصد، حلال B= ۲۰ درصد
تزریق‌کننده	لوپ: ۵۰ میکرولیتر و دمای ستون در ۴۰ درجه سانتیگراد
طول‌موج آشکارسازی	آموکسی‌سیلین در ۳۳۵ نانومتر ، کلوگزاسیلین در ۲۹۶ نانومتر و اریترومایسین در ۲۷۵ نانومتر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]



شکل ۱. بهینه‌سازی عوامل موثر در کارایی روش پیشنهادی برای استخراج باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی از شیر گاو

نتایج مشخصات تجزیه‌ای

پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه و ارائه گردیدند (۱۴). منحنی‌های کالیبراسیون با اسپایک کردن هشت غلظت از آنالیت‌های مورد مطالعه و رسم سیگنال تجزیه‌ای آنالیت‌ها پس از اجرای روش توسعه یافته ترسیم شد و محدوده خطی روش برای هر یک از آنالیت‌ها از منحنی کالیبراسیون بدست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش به ترتیب برابر غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز به‌ترتیب ۳ و ۱۰ می‌باشد درنظر گرفته شد. تکرارپذیری و دقت روش با استفاده از انحراف استاندارد نسبی (RSD %) حاصل شد. برای این‌منظور ۶ محلول حاوی ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر از آنالیت‌ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. درصد RSD بر اساس مساحت زیر پیک‌ها نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. نتایج اعتبارسنجی روش پیشنهادی در جدول ۲ ارائه شده است.

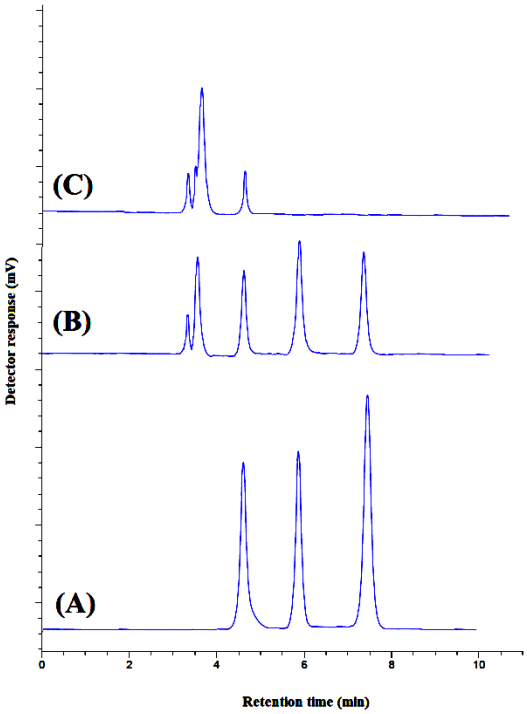
جدول ۲. مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی در استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر گاو

آنالیت	حد مجاز (نانوگرم در میلی‌لیتر)	محدوده خطی (نانوگرم در میلی‌لیتر)	ضریب تعیین (r^2)	حد تشخیص (نانوگرم در میلی‌لیتر)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در میلی‌لیتر)	درصد انحراف استاندارد نسبی (n= ۶)		فاکتور تغلیظ	راندمان
						در یک روز	بین روزها		
آموکسی‌سیلین	۴	۳/۷-۵۰۰	۰/۹۹۸	۱/۱	۳/۷	۳/۰	۳/۶	۱۹۵ ± ۵	۷۸ ± ۲
کلوگزاسیلین	۳۰	۳/۰-۵۰۰	۰/۹۹۴	۰/۹	۳/۰	۳/۲	۴/۱	۲۰۵ ± ۱۰	۸۲ ± ۴
اریترومایسین	۴۰	۲/۰-۵۰۰	۰/۹۹۹	۰/۶	۲/۰	۳/۷	۴/۵	۱۹۸±۱۱	۸۷ ± ۵

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]

آنالیز نمونه‌های حقیقی

قابلیت روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه و بررسی اثر بافت (Matrix) شیر در استخراج آنالیت‌ها با اندازه‌گیری آن‌ها در تعداد ۳۰ نمونه شیر گاو تحت شرایط بهینه‌سازی شده انجام شد. کروماتوگرام‌های HPLC-DAD حاصل نشان می‌دهند که تعداد ۸ نمونه شیر دارای باقیمانده آموکسی‌سیلین بوده و همگی آن‌ها بالاتر از حدمجاز باقیمانده یعنی ۴ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد.. شکل۱ کروماتوگرام محلول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها (هر کدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، نمونه‌های شیر آلوده شده به آنالیت‌های انتخابی (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و یک نمونه حقیقی شیر نشان می‌دهد.



شکل ۲. کروماتوگرام های HPLC-DAD محلول استاندارد (A)، نمونه شیر اسپایک شده با آنالیت‌های هدف (B) و نمونه شیر بدون اسپایک (C) پس از اجرای روش پیشنهادی. (۱): آموکسی‌سیلین، (۲): کلوگزاسیلین، (۳): اریترومایسین.

به دلیل اینکه مواد مختلفی مانند پروتئین‌ها و لاکتوز موجود در بافت شیر ممکن است در اندازه‌گیری آنالیت‌ها تداخل ایجاد نماید، صحت روش و اثر بافت در کارایی روش ارائه شده از طریق استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر اسپایک شده با غلظت‌های مختلفی از محلول‌های استاندارد تعیین گردید (۱۴). مقادیر بازیابی نسبی بدست آمده نشان داد ماتریکس نمونه‌ها در کارایی روش پیشنهادی تاثیر ناچیزی دارد.

جدول۳. مطالعه اثر بافت شیر در کارایی روش استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر گاو

آنالیت	انحراف استاندارد ± مقادیر بازیابی نسبی				
	نمونه۱	نمونه۲	نمونه۳	نمونه۴	نمونه۵
همه نمونه با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر اسپایک شدند					
آموکسی‌سیلین	۹۵±۴	۹۳±۷	۹۱±۲	۹۵±۷	۹۷±۵
کلوگزاسیلین	۹۴±۲	۹۰±۴	۹۴±۵	۹۶±۵	۹۷±۴
اریترومایسین	۹۹±۴	۹۷±۲	۹۸±۲	۹۳±۵	۹۲±۶
همه نمونه با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اسپایک شدند					
آموکسی‌سیلین	۹۲ ±۴	۱۰۰ ±۳	۹۶ ±۲	۹۵ ±۳	۹۰ ±۴
کلوگزاسیلین	۹۰ ±۵	۹۳ ±۴	۹۴ ±۵	۹۵ ±۳	۹۳ ±۳
اریترومایسین	۹۴ ±۳	۹۲ ±۷	۹۴ ±۴	۹۵ ±۶	۹۷ ±۳

• بحث

عوامل رسوب‌دهنده می‌توانند مزاحمت موادی از قبیل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌ها و غیره را در استخراج آنالیت‌های فاز آبی شیر حذف کنند و یکی از روش‌های متداول این کار در نمونه‌های شیر استفاده از اسید تری کلرو استیک است (۵). مقدار کم اسید تری‌کلرواستیک قادر به رسوب‌دهی کامل پروتئین‌ها نخواهد بود و از طرفی، مقدار زیاد آن نیز می‌تواند سبب تغییر ماهیت نمونه شود لذا بهینه‌سازی مقدار آن لازم است (۱۵).

یکی از پارامترهای مهم در اجرای روش استخراج توسعه داده شده، انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده می‌باشد. حلال استخراج‌کننده بایستی حلالیت کمی در فاز آبی داشته و قابلیت پخش شدن در آن را داشته باشد. از طرف دیگر این حلال یا باید دارای دانسیته متفاوت از آب باشد تا جمع‌آوری آن با سانتریفیوژ ممکن باشد (۶).

حجم این حلال نیز بازده استخراج و تکرارپذیری نتایج را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد یعنی حجم بالای حلال سبب افزایش حجم فاز جمع‌شده پس از استخراج، کاهش فاکتور تغلیظ و بنابراین کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای خواهد شد. ضمنا کاهش حجم حلال نیز موجب کاهش کارایی استخراج و تکرارپذیری می‌گردد لذا حجم حلال استخراج‌کننده باید بهینه‌سازی شود (۱۶). در این مطالعه افزایش حجم حلال استخراج‌کننده در مقادیر بالاتر از ۵۰ میکرولیتر تاثیری در افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای نداشت. لازم به‌ذکر است که در حجم‌های کمتر از ۵۰ میکرولیتر حجم فاز ته نشین شده کم بوده و نتایج تکرارپذیر نبود.

ایجاد قدرت یونی محلول آزمایشی به‌وسیله افزایش کلرید سدیم ضمن اینکه می‌تواند سبب کاهش میزان دسترسی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]

مولکول‌های آنالیت به آب و بنابراین انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج کننده و در نتیجه افزایش کارایی استخراج شود، از طرفی نیز ممکن است حل شدن حلال استخراج کننده در فاز آبی را کاهش داده و منجربه افزایش حجم فاز آلی جمع‌شده و کاهش سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق‌سازی شود (۱۷). لذا یکی از پارامترهای موثر در اکثر روش‌های استخراج است که نیاز به ارزیابی و بهینه‌سازی دارد.

دمای فاز آبی از دیگر عوامل مؤثر در فرآیند پیشنهادی است به‌طوریکه گرم شدن محلول آبی می‌تواند موجب پخش بهتر حلال استخراج کننده در محلول آبی شده و با تغییر ضرایب انتشار سرعت استخراج را تحت تأثیر قرار دهد و در نتیجه، سطح تماس بین حلال و نمونه افزایش یافته و سرعت انتقال و استخراج آنالیت‌ها بهبود پیدا میکند. البته افزایش دما می‌تواند با انتشار بیشتر آنالیت‌ها به داخل فاز آبی سبب کاهش راندمان استخراج شود. بنابراین مقادیر سیگنال‌های تجزیه‌ای در دماهای مختلف تغییر خواهد کرد (۱۸).

به‌منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی، برخی پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر با چند روش به‌کار رفته برای استخراج این آنالیت‌ها از نمونه‌های شیر مقایسه شد. این بررسی نشان داد مقادیر شایستگی روش ارائه شده قابل قبول می‌باشد به‌طوریکه حد تشخیص بدست برای آموکسی سیلین در تحقیق حاضر (۱/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر)، قابل مقایسه با روش‌های انجام شده با کروماتوگرافی مایع مجهز به شناساگرهای بسیار حساس‌تر (LC-MS/MS) بود که در آن‌ها حد تشخیص این آنالیت یک نانوگرم در میلی‌لیتر (۱۹) و ۰/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر (۲۰) بوده است. همچنین حد تشخیص کلوگزاسیلین بدست آمده (۰/۹ نانوگرم در میلی‌لیتر) پایین‌تر از مقادیر این پارامتر در بکارگیری روش LC-MS/MS در مطالعات دیگر یعنی ۲ نانوگرم در میلی‌لیتر است (۱۹). به‌علاوه حدود تشخیص اریترومایسین در دو تحقیق انجام شده بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (۲۱) و ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر (۲۲) گزارش شده است که بسیار بالاتر از حد تشخیص بدست آمده در این کار (۰/۶ نانوگرم در میلی‌لیتر) می‌باشد. همچنین در مقایسه با سایر روش‌ها، روش توسعه داده شده مقادیر قابل قبولی برای راندمان استخراج (۲۱، ۱۹) و تکرارپذیری (۲۲، ۲۰) آنالیت‌های هدف ارائه کرده است.

نتیجه‌گیری

این کار پژوهشی روش میکرو استخراج مایع مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی برای استخراج و پیش‌تغلیظ باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلوگزاسیلین و اریترومایسین در نمونه‌های شیر گاو با استفاده از کروماتوگرافی‌مایع با کارائی بالا استفاده شد. سادگی روش، قابل اعتماد بودن، مصرف حلال‌های سبز و با سمیت کمتر را می‌توان از جمله مزایای روش توسعه داده شده بر شمرد. اعتبار بخشی روش نشان دهنده پارامترهای تجزیه‌ای مطلوب بود به‌گونه‌ای که راندمان استخراج بالای ۷۸ درصد و فاکتور تغلیظ بیش از ۱۹۵ حاصل شد. همچنین حد تشخیص روش پیشنهادی کمتر از حداکثر مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آنتی‌بیوتیک‌ها بود. روش مذکور به‌طور موفقیت‌آمیزی بر روی نمونه‌های شیر انجام گرفت و آنالیز نمونه‌های حقیقی فقط وجود آموکسی سیلین در ۸ نمونه شیر را نشان داد که همگی بالاتر از حد مجاز بودند.

• References

1. Sachi S, Ferdous J, Sikder MH, Hussani SAK. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. J. Adv. Vet. Anim. Res. 2019;6(3):315.
2. Jayalakshmi K, Paramasivam M, Sasikala M, Tamilam T, Sumithra A. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. J Entomol Zool Stud. 2017;5(3):1446-51.
3. Vishnuraj M, Kandeepan G, Rao K, Chand S, Kumbhar V. Occurrence, public health hazards and detection methods of antibiotic residues in foods of animal origin: A comprehensive review. Cogent Food & Agriculture. 2016;2(1):1235458.
4. Ghasemi R, Mirzaei H, Mogaddam MRA, Khandaghi J, Javadi A. Application of magnetic ionic liquid-based air–assisted liquid–liquid microextraction followed by back-extraction optimized with centroid composite design for the extraction of antibiotics from milk samples prior to their determination by HPLC–DAD. Microchem. J. 2022;181:107764.
5. Rasi H, AfsharMogaddam M, Khandaghi J. Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. Journal of food science and technology (Iran). 2021;18(113):339-49 [in Persian].
6. Meshkini K, Afshar Mogaddam M, Khandaghi J. Development of Homogeneous Liquid-Liquid Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Deep Eutectic Solvents for the Extraction and Assessment of Phytosterols in Animal Cream Samples using Gas Chromatography Equipped with Flame Ionization Detector. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2021;16(2):57-67 [in Persian].
7. Rastpour N, Khandaghi J, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR. Deep eutectic solvent-based QuEChERS method combined with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of benzoylurea insecticides in cabbage leaves samples. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2020; 102(12):2778-91.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]

8. Limoei Khosrowshahi B, Marzi Khosrowshahi E, Afshar Mogaddam M, KHandaghi J. Use of Dispersive Solid-Phase Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Assessment of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juice Samples Using Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorus Detector. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2022:87-98 [in Persian].

9. Pirsa S, Alizadeh N. Rapid determination of pyridine derivatives by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography/gas sensor based on nanostructured conducting polypyrrole. Talanta. 2011;87:249-54.

10. Pirsa S, Alizadeh N. Nanoporous conducting polypyrrole gas sensor coupled to a gas chromatograph for determination of aromatic hydrocarbons using dispersive liquid–liquid microextraction method. IEEE Sens. J. 2011;11(12):3400-5.

11. Gholizadeh S, Mirzaei H, Khandaghi J, Mogaddam MRA, Javadi A. Ultrasound–assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. J. Food Compost. Anal. 2022;114:104831.

12. Nie L, Cai C, Guo R, Yao S, Zhu Z, Hong Y, et al. Ionic Liquid-Assisted DLLME and SPME for the Determination of Contaminants in Food Samples. Separations. 2022;9(7):170.

13. Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. Die Pharmazie-An Int. J. Pharm. Sci. 2007;62(1):4-14.

14. https://www.idbs.com/blog/2019/07/ich-m10-bioanalytical-method-validation-guideline-what-the-new-draft-means-for-bioanalysis. Access date: 11/14/2022.

15. Mogaddam MRA, Nemati M, Farajzadeh MA, Lotfipour F, Nabil AAA, Mohebbi A, et al. Application of natural deep eutectic solvents-based in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of five acaricides in egg samples. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2020:1-16.

16. Khani F, Khandaghi J, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR. Cold-induced Homogenous Liquid–Liquid Extraction Performed in a Refrigerated Centrifuge Combined with Deep Eutectic Solvent-based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Extraction of Some Endocrine Disrupting Compounds and Hydroxymethylfurfural from Honey Samples. Food Anal. Methods. 2021;14(10):2063-75.

17. Zare Sani M, Mogaddam MRA, Khandaghi J. Combination of cold induced HLLME with an effervescence-assisted DLLME based on deep eutectic solvent decomposition; application in extraction of some pyrethroid and carbamate pesticides from edible oils. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2021:1-16.

18. Lemos VA, Oliveira LA. Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples. Food Control. 2015;50:901-6.

19. Holstege D, Puschner B, Whitehead G, Galey F. Screening and mass spectral confirmation of β-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 2002;50(2):406-11.

20. Martins-Júnior HA, Kussumi TA, Wang AY, Lebre DT. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. J. Braz. Chem. Soc. 2007;18:397-405.

21. Xie Y, Hu Q, Zhao M, Cheng Y, Guo Y, Qian H, et al. Simultaneous determination of erythromycin, tetracycline, and chloramphenicol residue in raw milk by molecularly imprinted polymer mixed with solid-phase extraction. Food Anal. Methods. 2018;11(2):374-81.

22. Edder P, Coppex L, Cominoli A, Corvi C. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. Food Addit. Contam. 2002;19(3):232-40.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]

Use of Temperature-controlled Ionic Liquid-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Amoxicillin, Cloxacillin and Erythromycin Residues in Cow Milk using High Performance Liquid Chromatography

Afshar Mogaddam MR[1,2], Khandaghi J[3,4], Vajdi Hokmabad S[5]*

1- Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor of Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

4- Assistant Professor of Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*5- *Corresponding author: Assistant Professor of Department of Animal Science, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran Email: Samad.Vajdi@iausa.ac.ir*

Received 27 Dec, 2022 **Accepted 6 Mar, 2023**

Background and Objectives: Different types of antibiotics are used indiscriminately in animal husbandry for the growth and treatment of livestock, which cause accumulation of antibiotic residues in livestock products such as milk. Long-term consumption of milk contaminated with antibiotic residues above the permissible limits is harmful to human health, causing antibiotic resistance problems. Therefore, monitoring of antibiotic residues in milk and dairy products is particularly important.

Materials and Methods: In this study, temperature-controlled ionic liquid-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method was developed for the extraction of amoxicillin, cloxacillin and erythromycin residues from cow milk and their assessment were carried out using high-performance liquid chromatography equipped with a diode array detector. Furthermore, effects of various parameters on the extraction efficiency such as volume of precipitating agent and vortexing time, type and quantity of extracting solvent, effects of salt addition and temperature of aqueous solution were optimized.

Results: Analysis of milk samples showed presence of amoxicillin in eight milk samples, all of which included values greater the permissible limits. No other antibiotics were detected in the milk samples. The suggested method included high efficiencies in extracting the target antibiotic residues from milk samples. Therefore, repeatability of the method based on relative standard deviation proportion included 3–4.5. Under optimal conditions, extraction recoveries were in range of 78–87% and the limits of detection and quantification less than 1.1 and 3.7 ng/ml were reported, respectively.

Conclusion: The developed method is appropriate for the determination of selected analytics in cow milk and its detection limit is lower than the maximum residue limits for the residues of these antibiotics.

Keywords: Antibiotic, Milk, DLLME, Method development, HPLC

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1402.18.1.10.7]